

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 32320131153384

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

一种 RAR_γ 新型配体及其生物学活性的研究

Identifying a novel RAR_γ ligand and exploring its
biological function

凌小滨

指导教师姓名: 周 虎教授

张晓坤教授

苏 迎教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: 吴振

评阅人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

视黄酸受体 γ (Retinoic Acid Receptor gamma, RAR γ), 作为核受体超家族重要成员之一, 在生物体生长、发育、代谢、免疫、分化、增殖、炎症、凋亡等过程中均发挥着重要作用。RAR γ 一般与核受体 RXR α 形成异源二聚体形式, 在细胞核发挥调控基因转录的活性。但是近年来的研究发现, RAR γ 以及其他一些核受体会出核与胞质中的蛋白直接相互作用进而快速参与到胞外的信号调控, 发挥核受体的“非基因型作用”。因此, RAR γ 一直以来都是药物干预和治疗过程中重要且极具吸引力的靶点, 而寻找 RAR γ 的新型配体对于揭示 RAR γ 新的生物学活性和作为特定疾病治疗靶点的潜能具有重要的意义。

本课题基于以上理念, 通过报告基因筛选系统, 从化合物库筛选到选择性调控 RAR γ 的化合物 XS-0005。XS-0005 是一个苯基硫脲芳香类化合物, 是本课题组根据之前发表的 RXR α 的 coregulator 表面结合位点的结构, 利用 visual screening 技术从小分子化合物库筛选并从 specs 公司购买获得, 到目前为止还没有关于其活性的研究报道。我们在筛选的过程中发现 XS-0005 化合物对 RAR γ 有特异的转录抑制作用, 并通过体外实验证明 XS-0005 与 RAR γ 存在直接结合。我们通过体外结合实验和 Glide docking 的方法推测其在 RAR γ 上的可能结合位点和对结合起关键作用的氨基酸, 结果发现 XS-0005 可能并不结合在核受体经典的 LBP 口袋, 而是结合在表面 coregulator 的结合位置。RAW264.7 小鼠巨噬细胞中, 我们发现 XS-0005 能够抑制本底以及炎症因子 LPS 激活的 ERK 通路, 其作用机制可能是通过促进 RAR γ 与 TRAF6 的相互作用进而诱导 TRAF6 的降解。另外, 我们发现在 MCF-7 人乳腺癌细胞中 XS-0005 也会诱导 TRAF2 的降解并抑制 ATRA 对 AKT 的激活。在生理功能上, 我们发现 XS-0005 会使 RAW264.7 小鼠巨噬细胞周期阻滞在 S 期并诱导细胞凋亡。

因此, 本研究揭示了一个新型的 RAR γ 的配体 XS-0005, 其可能通过结合在 RAR γ 表面 coregulator 的结合位点, 进而调节 RAR γ 的活性。同时, 本研究揭示 XS-0005 新的 RAR γ 依赖的生物学活性及可能的作用机制, 即 XS-0005 可能通过增强 RAR γ 和 TRAF6 的相互作用, 进而促进 TRAF6 的降解和抑制 ERK 的激活。

关键字: XS-0005; RAR γ ; 信号通路; TRAF6

Abstract

As a member of nuclear receptor superfamily, retinoic acid receptor gamma (RAR γ) has a pivotal role in a variety of physiological activities including growth, development, metabolism, immunity, differentiations, proliferation, inflammation and apoptosis. In general, RAR γ forms heterodimer with RXR α in nucleus to regulate gene transcription. However, recent reports have revealed that many nuclear receptors including RAR γ regulate some signal pathways in cytoplasm via their direct interaction with some signal proteins, which represents the non-genomic functions of nuclear receptors. The dysfunctions of both the genomic and non-genomic activities of RAR γ are highly related to some disease development. Therefore, it's very important that study and discovery of the novel ligands of RAR γ with therapeutical effects.

XS-0005 belongs to a series of Phenyl thiourea aromatic compounds that we first obtained via visual screening as binders of RXR α co-regulator binding site. After screening with yeast-one-hybrid assay, we surprisedly found that XS-0005 strongly inhibited ATRA-induced RAR γ transactivation rather than 9-cis-RA-induced RXR α transactivation. Also, the effect of XS-0005 on inhibiting RAR γ transactivation is highly selective among 8 nuclear receptors examined. Our in vitro binding assays showed that XS-0005 could bind to RAR γ directly. We predicted that XS-0005 might bind to the co-regulator binding site but not the traditional ligand-binding pocket of RAR γ by using the glide docking assay. In its biologic functions study, we found that XS-0005 could strongly inhibit basal and LPS-induced ERK activation, which may be due to its downregulation of TRAF6. Further study revealed that XS-0005 enhanced the interaction of RAR γ and TRAF6 in RAW264.7 cells, which may lead to its induction of TRAF6 degradation through binding to RAR γ . Similarly, XS-0005 also downregulated the expression of TRAF2 and inhibited the ATRA-induced AKT activation in MCF-7 cells. At last, we showed that XS-0005 could induce RAW264.7 cell cycle arrest on S phase and apoptosis.

Taken together, our study revealed that XS-0005 is a novel ligand of RAR γ with

specific binding mode and RAR γ -dependent biological activities.

Key words: XS-0005; RAR γ ; Signal pathway; TRAF6

厦门大学博士论文摘要库

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前 言	1
1.1 核受体概述	1
1.2 视黄酸受体（RAR）	3
1.2.1 RAR 概述.....	3
1.2.2 RAR γ 的基因型功能.....	3
1.2.3 RAR γ 的非基因型功能.....	4
1.3 化合物 XS-0005 背景	5
1.4 LPS 和 ERK 交互关系概述	5
1.4.1 LPS 概述.....	5
1.4.2 ERK 信号通路概述	6
1.4.3 LPS 调控 ERK 信号通路	6
1.5 PI3K/AKT 通路概述.....	7
1.5.1 PI3K 的结构和分类	8
1.5.2 AKT 的结构和分类.....	8
1.5.3 PI3K/ AKT 信号通路途径及其调控	8
1.6 TRAF2 和 TRAF6 在信号通路中的角色.....	10
1.7 研究的目的，内容与意义	10
第二章 材料与amp;方法	12
2.1 实验材料	12
2.1.1 细胞株	12
2.1.3 仪器	13
2.1.4 菌株	14
2.1.5 表达载体	14
2.1.6 主要溶液	14
2.2 实验方法	17
2.2.1 质粒构建	17

2.2.2 大量原核表达蛋白	19
2.2.3 细胞培养	19
2.2.4 细胞转染	20
2.2.5 细胞干扰	21
2.2.6 Co-IP 免疫共沉淀	21
2.2.7 Western blotting	21
2.2.8 流式细胞术	22
2.2.9 核质分离	22
2.2.10 免疫荧光	24
2.2.11 考马斯亮蓝染色	25
2.2.12 报告基因检测	25
2.2.13 表面等离子共振 SPR	26
2.2.14 HPLC	27
2.2.15 荧光分光光度滴定	28
2.2.16 虚拟筛选法	29
2.2.17 统计学分析	30
第三章 结果与分析	31
3.1 XS-0005 选择性调节 RAR γ 的转录活性	31
3.1.1 XS-0005 化合物选择性调节 RAR γ 转录活性的初筛	31
3.1.2 XS-0005 浓度依赖的选择性抑制 RAR γ 的转录活性	36
3.2 XS-0005 与 RARγ 直接结合	37
3.2.1 SPR 法证实 XS-0005 与 RAR γ -LBD 相结合	37
3.2.2 荧光分光光度滴定法进一步证实 XS-0005 与 RAR γ -LBD 相结合	38
3.2.3 HPLC 法定性证明	40
3.2.3.1 LC-MS 法证实 XS-0005 与 RAR γ -LBD 结合产生的杂峰是一个类似塑料的高聚物产生的峰	41
3.3 XS-0005 binding mode 的初步研究	42
3.3.1 Glide Docking 的方法模拟 XS-0005 与 RAR γ -LBD 中的 LBP 结合	43
3.3.2 Glide Docking 的方法模拟 XS-0005 与 RAR γ -LBD 中的 Coregulator binding site 的结合	45
3.4 在体外 XS-0005 对 RARγ 多聚体形成的影响	47

3.5 XS-0005 的生物学活性	48
3.5.1 XS-0005 抑制 LPS 激活的 ERK 通路	48
3.5.2 XS-0005 促进 RAR γ 与 TRAF6 的相互作用	50
3.5.3 XS-0005 抑制 TRAF6 的表达	51
3.5.4 XS-0005 抑制 TRAF2 的表达并抑制 ATRA 激活的 AKT 通路	52
3.5.5 XS-0005 将细胞周期阻滞在 S 期并诱导细胞凋亡	53
第四章 讨 论	56
4.1 报告基因是药物筛选的有效手段	56
4.2 XS-0005 化合物能够有效结合 RAR γ , 且其结合 RAR γ 的方式跟 ATR 可能不同	56
4.3 XS-0005 并不改变 RAR γ 二聚体或四聚体的形成	57
4.4 XS-0005 抑制 LPS 激活的 ERK 通路, 并且在单独处理的时候也能抑制 ERK 的活性。	57
4.5XS-0005 促进 RAR γ 与 TRAF6 的相互作用	58
4.6XS-0005 抑制 TRAF6 的表达	58
4.7XS-0005 降解 TRAF2 并抑制 ATRA 激活的 AKT 通路	58
4.8XS-0005 将细胞周期阻滞在 S 期并诱导细胞凋亡	59
第五章 结 论	60
附录 1 中英文对照表	61
参考文献	64
致谢	69

Content

Abstract of Chinese.....	I
Abstract.....	II
Chapter I Introduction	1
1.1 Interduction of nuclear receptor	1
1.2 Retinoic Acid Receptor (RAR)	3
1.2.1 Interduction of RAR γ	3
1.2.2 Genomic action of RAR γ	3
1.2.3 Nongenomic action of RAR γ	4
1.3 Background of compound XS-0005.....	5
1.4 Interduction interactive relationship of LPS and ERK	5
1.4.1 Interduction of LPS	5
1.4.2 Interduction of ERK signal pathway.....	6
1.4.3 Regulation of ERK by LPS	6
1.5 Interduction of PI3K/AKT signal pathway	7
1.5.1 Structure and classification of PI3K	8
1.5.2 Structure and classification of AKT	8
1.5.3 Regulation of PI3K/AKT signal pathway	8
1.6 Role of TRAF2 and TRAF6 in signal pathway	10
1.7 Purpose ,content and significance of the research	10
Chapter II Materials and Methods	12
2.1 Experiment Materials	12
2.1.1 Cell lines	12
2.1.3 instruments.....	13
2.1.4 Bacteria.....	14
2.1.5 Expression Vector	14
2.1.6 Main buffer	14
2.2 Expriment methods.....	17
2.2.1 plasmid construction	17

2.2.2 Expression of protein in <i>E.coli</i> -BL21	19
2.2.3 Cell culture	19
2.2.4 Cell transfection.....	20
2.2.5 Cell interference	21
2.2.6 Co-Immunoprecipitation	21
2.2.7 Western blotting.....	21
2.2.8 FCM(flow cytometry).....	22
2.2.9 Nuclear and cytoplasmic separation	22
2.2.10 immunofluorescence	24
2.2.11 Coomassie brilliant blue staining.....	25
2.2.12 Reporter assay	25
2.2.13 surface plasma resonance SPR	26
2.2.14 HPLC.....	27
2.2.15 Fluorescence spectrophotometric titration	28
2.2.16 Virtual screening method	29
2.2.17 statistical analysis	30
Chapter III Results and analysis	31
3.1 Selective adjusted transcription activity of RARγ by XS-0005.....	31
3.1.1 Antagonistic effect of compound XS-0005	31
3.1.2 Concentration-dependent antagonistic effect of compound XS-0005	36
3.2 XS-0005 binds to RARγ directly	37
3.2.1 SPR assays for XS-0005 binds His-RAR γ -LBD	37
3.2.2 Fluorescence spectrophotometric titration assay for XS-0005 binds His-RAR γ -LBD	38
3.2.3 HPLC assays for XS-0005 binds His-RAR γ -LBD	40
3.2.3.1 LC-MS assays for HPLC samples.....	41
3.3 XS-0005 binding mode.....	42
3.3.1 Glide docking of XS-0005 and RAR γ Ligand Binding Domain	43
3.3.2 Glide docking of XS-0005 and RAR γ Coregulator-Binding Site	45
3.4 Influence of XS-0005 to RARγ polymer in vitro	47

3.5 Biological activities of XS-0005	48
3.5.1 Inhibition of ERK activation in macrophage cells by XS-0005	48
3.5.2 Enhance of TRAF6 interaction with RAR γ by XS-0005	50
3.5.3 Inhibited expression of TRAF6 by XS-0005	51
3.5.4 Inhibited expression of TRAF6 and inhibition of ATRA activatedPI3K/AKT activation by XS-0005	52
3.5.5 Blocking cell cycle to S and induction of cell apoptosis by XS-0005	53
Chapter IV Discussion	56
Chapter V Conclusion	60
Appendix I List of Abbreviation	61
Reference	64
Acknowledgement	69

第一章 前言

1.1 核受体概述

核受体超家族是一大类配体依赖型的转录因子，主要位于细胞核内或是通过相应配体结合后由胞浆转到细胞核内的受体，是多细胞生物体内含量最丰富的几大类转录因子超家族成员之一^[1]。核受体家族的主要功能是通过配体激活，在核内或胞质内调控发育、代谢、生殖等相关基因和蛋白水平的表达。比方：他莫西芬可以通过拮抗雌激素受体（ER）治疗乳腺癌^[2]；而临床报告显示，曲格列酮^[3]、罗格列酮^[4]可增强 II 型糖尿病患者的胰岛素分泌降低血糖而缓解糖尿病，而这都是通过配体激活受体(PPAR γ)而发挥作用；另外，肝 X 受体(LXR)和胆酸受体(FXR)在治疗糖尿病、癌症时均为潜在的靶点^[5]。二十世纪末以来，各类核受体(nuclear receptor, NR)以惊人的速度被鉴定和发现，使得核受体结构和功能成为分子生物学的中心热点之一。

核受体超家族成员具有共同的结构特点，如图所示：

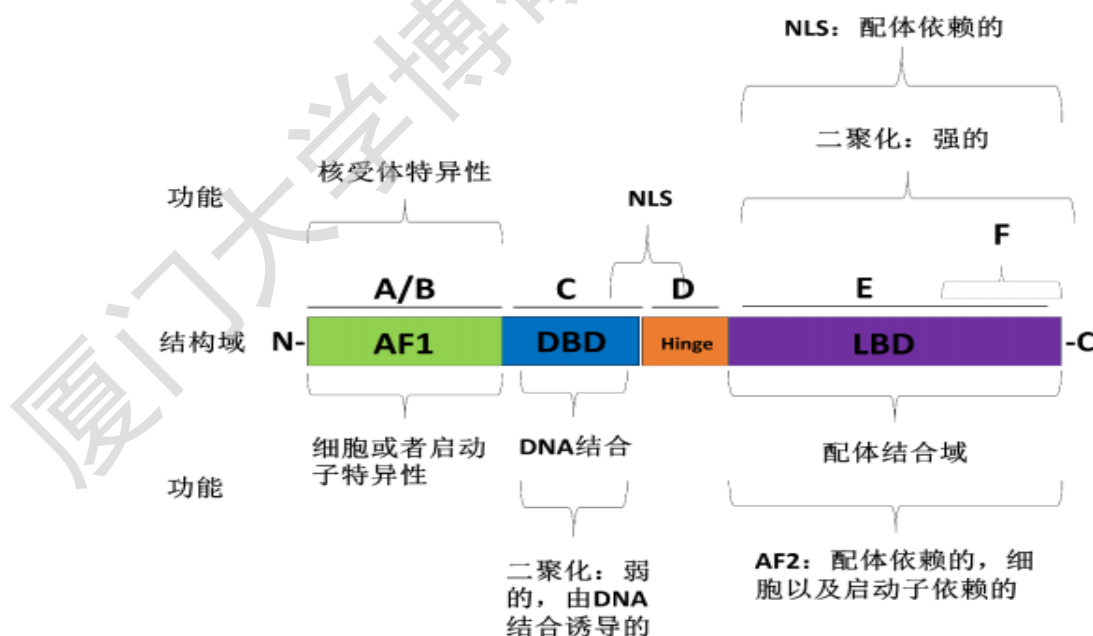


图 1.1 核受体超家族结构组成特征（引自参考文献 1）

Fig.1.1 The Structure of Nuclear Receptor

一个典型的核受体分子由 A、B、C、D、E、F 六个部分组成^[6]。其中, A/B 区(N 端)的可变性最大, 包括至少一种本身有活性的配体非依赖性的转录激活域(AF-1), A/B 结构域由 50 至 500 多个氨基酸组成。C 区是其最保守的区域, 即 DNA 结合区(DBD), 主要参与 DNA 的结合。C 结构域由两个锌指结构组成, 每个锌指结构由 4 个半胱氨酸和中心部位的一个锌离子螯合而成。在锌指 I 的柄部有三个不连续的氨基酸称为 P 盒, 它决定了受体作用的特异性。D 区位于 C 区与 E 区之间被称为铰链区(hinger region), 铰链区较短且柔性很高, 利于受体识别和结合 DNA, 核定位信号肽也在 D 区。E 区具有相对较高的保守性, 被称为配体结合区(ligand-binding domain, LBD)。E 结构域由 10-12 个 α 螺旋和两个 β 折叠组成, 其中第 12 个螺旋序列高度保守, 是转录激活域 AF2 的核心区域。LBD 区的 α 螺旋与 β 折叠排列成一个螺旋三明治的疏水结构, 配体结合口袋(ligand-binding pocket, LBP)就位于这个结构的内部。LBP 结合配体后, 受体的构象会被诱导形成同源或异源二聚体进而调控基因转录或细胞内定位, 影响细胞的各种生理过程。F 区不是所有核受体都有, 其中视黄酸受体 RAR 含有 F 区, 位于 E 区的羧基端的最外头。F 结构域序列高度可变, 其结构和功能尚不清楚。此外, 在 A/B 区域和 E 区域各包含一个转录激活功能域(activation function, AF) 分别称为 AF-1 和 AF-2^[7]。它们主要负责转录起始相关蛋白的招募。

核受体按照作用模式和配体选择性分为三大家族: 第一类固醇激素受体, 如雌激素受体(estrone receptor, ER)、雄激素受体(androgen receptor, AR)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)和盐皮质激素受体(mineralcorticoid receptor, MR)等; 第二类非类固醇激素受体, 如视黄酸受体(Retinoic Acid Receptor, RAR)、类视黄醇 X 受体(retinoid X receptor, RXR)、甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, TR)和维生素 D3 受体(vitamin D3 receptor, VDR)等; 第三类孤儿核受体, 就是目前为止还没有发现配体的一类核受体, 如 DAX1

(NR0B1)、SHP(short heterodimer partner, NR0B2)和 Nur77(nuclear receptor subfamily 4 group A member 1, NR4A1)等^[8, 9]。

1.2 视黄酸受体 (RAR)

1.2.1 RAR 概述

视黄酸受体 (Retinoic Acid Receptor, RAR) 是核受体超家族的重要成员之一, 与视黄醇 X 受体(Retinoid X Receptors, RXRs)共同介导视黄醇(retinoids)的生物学作用。视黄醇是一类天然的或人工合成的维生素 A 衍生物, 能够调节诸如细胞的增殖、分化、凋亡、视觉形成、骨骼形成、造血、胚胎发育、繁殖、新陈代谢等关键的生命活动过程^[10-15]。许多维生素 A 衍生物已经被应用在治疗癌症及其它疾病。例如 all-trans-RA 已被用于治疗早幼粒白血病; Targretin 已被应用于皮肤癌的治疗, 目前在临床上被证明对肺癌和乳腺癌也有很好的治疗效果。

RAR 有三个不同的亚型, 即 RAR α 、RAR β 和 RAR γ 。这些不同亚型之间虽然由不同的基因编码但是具有某些相似的核内转录调控机制, 使其在功能上存在一定程度的冗余性。通过比较这三种亚型的同源性可知 C 区的同源性最高, 为 94 % 和 97 %, E 区的同源性为 84 % 和 90 %, 而 A/B 区和 F 区几乎没有明显的同源性^[16]。由于结构以及分布上的差异, 不同的亚型之间也承担着独特的功能, 但这些功能还有待进一步的认识^[17]。RAR 的各亚型在胚胎发育的过程中, 以及在成熟组织中的表达情况也不一样, 这些结构和时空上表达的不同, 提示我们不同的亚型可能介导不同的生物学功能。

1.2.2 RAR γ 的基因型功能

相对 RAR α 和 RAR β 而言, 人们对 RAR γ 的认识还不是太深入。先前的报道 RAR γ 的生物学功能主要是和生长分化相关, 比如有研究报导在鼠角质细胞中 RAR γ 在 Ras 诱导肿瘤形成、RA 诱导的细胞周期停滞和凋亡中起重要作用^[18]; RAR γ 在调节造血干细胞自我更新和分化的平衡中起重要作用。核受体 (包括 RAR γ) 的经典功能是指他的基因型作用。基因型作用是指通过核受体与 DNA 上相应元件的直接相互作用来调节靶基因的表达, 或者通过与一些转录因子之间相互作用, 而不通过直接与 DNA 结合来调节基因的表达。例如, 在转录调控水平, 过表达 RAR γ 能抑制 RA 靶基因的转录活性^[19]; 在 F9 细胞中, 一些 RAR γ

的靶基因已经被鉴定出来^[20]。但随着研究的深入,人们发现 RAR γ 等核受体还有一些生物学功能不能用经典的基因型功能来解释,说明核受体还存在着非基因型功能作用机制。

1.2.3 RAR γ 的非基因型功能

“非基因型功能”(nongenomic action)是指核受体不依赖于调控 mRNA 和蛋白质的合成,而定位到细胞内不同的亚细胞结构上,通过直接与其他蛋白发生相互作用,快速调控细胞内多种信号通路的作用方式。已有报道显示:有些核受体的配体能够快速激活一些激酶,例如一些视黄素能够快速激活 GTPase、Rac、PKC、ERK2、CREB 和磷酸肌醇-3 激酶^[21-26];在神经细胞中,RAR γ 与细胞质中的 c-Src 蛋白相互作用,是 RA 介导的神经元分化所必须的^[27]。雌激素可以快速激活雌激素受体 ER α 与 p85 相互作用,继而激活 Akt 信号通路,促进 eNOS 的合成,行使保护心血管的功能^[28]。此外,在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤中,RAR α 可与胞质内的 p85 α 发生作用,激活 PI3K/Akt 信号通路以及 ERK、MAPK 信号通路,最终导致成神经细胞瘤的分化^[29]。还有,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)刺激嗜络细胞瘤细胞 PC12,磷酸化 Nur77,磷酸化的 Nur77 携带 RXR α 从核内定位到细胞质中^[30]。在 C57BL/6 雄性老鼠中,脂多糖(LPS)通过激活 c-jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK)诱导 RXR α 出核行使生理功能^[31]。

在研究肿瘤的发生发展过程中发现经常伴有的 RAR γ 发挥着非基因型功能,使 RAR γ 成为一个很好的药物靶标。例如,在多种癌细胞系中发现,当存在血清,EGF,PEGF 等生长因子的条件下,RAR γ 会定位在核外,说明在环境条件比较好的条件下,RAR γ 在核外发挥促生存的功能;在检测肝癌组织中,RAR γ 会过表达,进一步研究在肝癌细胞中 ATRA 刺激的情况下会促进 RAR γ 和 p85 α 的相互作用,进而促进了 p-AKT 蛋白水平的增加,走向了促生存的通路;在急性粒细胞白血病中,RAR γ 与 CDK1 相互作用,阻止 CDK1 促进细胞周期,使细胞周期阻止在 G0/G1 期也提示我们如果某化合物能够促进 RAR γ 与 CDK1 的相互作用,并且由于是在核外发挥功能,可以起到相对基因型功能副作用较小的治疗作用;在造血干细胞中也发现 RAR γ 有促进生长的作用。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.